

⑤1

Int. Cl. 2:

A 61 31/70

①9 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



Behördenstempel

DT 25 47 696 A 1

①1

Offenlegungsschrift 25 47 696

②1

Aktenzeichen: P 25 47 696.4

②2

Anmeldetag: 24. 10. 75

④3

Offenlegungstag: 28. 4. 77

③0

Unionspriorität:

③2 ③3 ③1

⑤4

Bezeichnung:

Antivirale Substanz, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Substanz enthaltende Arzneipräparate

⑦1

Anmelder:

Beecham Group Ltd., Brentford, Middlesex (Großbritannien)

⑦4

Vertreter:

Jung, E., Dipl.-Chem. Dr.phil.; Schirdewahn, J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.;
Schmitt-Nilson, G., Dr.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦2

Erfinder:

Harnden, Michael Raymond, Horsham, Sussex;
Vere-Hodge, Richard Anthony, Dorking, Surrey (Großbritannien)

DT 25 47 696 A 1

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Antivirale Substanz, die im wesentlichen ein ionischer Komplex ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Kationen Polykationen eines linearen Polyarginin-Moleküls mit mindestens 5 Arginin-Einheiten und die Anionen entweder
 - a) Polyanionen einer doppelstrangigen Ribonucleinsäure natürlichen Ursprungs oder
 - b) Polyanionen eines doppelstrangigen Derivats einer natürlichen doppelstrangigen Ribonucleinsäure sind.
2. Antivirale Substanz, nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kationen Poly-L-Arginin-Kationen sind.
3. Antivirale Substanz nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die doppelstrangige Ribonucleinsäure aus Virusteilchen von infizierten Stämmen von *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium stoloniferum*, *Aspergillus niger* oder *Aspergillus foetidus* stammt.
4. Antivirale Substanz nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die doppelstrangige Ribonucleinsäure die replikative Form eines Phagen ist.
5. Antivirale Substanz nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die doppelstrangige Ribonucleinsäure die replikative Form einer Phagen-Mutante MU9 eines MS2-Escherichia coli-Phagen ist.

6. Antivirale Substanz nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß im wesentlichen alle Anionen der doppelstrangigen Ribonucleinsäure oder deren Derivat an einer ionischen Bindung mit den Polyarginin-Kationen beteiligt sind.
7. Verfahren zur Herstellung der antiviralen Substanz nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man in Lösung lineares Polyarginin oder dessen Salz mit entweder
- a) Polyanionen einer doppelstrangigen Ribonucleinsäure natürlichen Ursprungs oder
 - b) Polyanionen eines doppelstrangigen Derivats einer natürlichen doppelstrangigen Ribonucleinsäure umsetzt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man eine wässrige Elektrolytlösung eines Polyarginins mit einer wässrigen Elektrolytlösung einer doppelstrangigen Ribonucleinsäure oder deren doppelstrangigem Derivat vermischt.
9. Arzneipräparat, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer antiviralen Substanz nach Anspruch 1 bis 6 als Wirkstoff, gegebenenfalls in Kombination mit üblichen pharmakologisch verträglichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln.
10. Arzneipräparat nach Anspruch 9, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen Gehalt an einem lebenden oder abgetöteten Virus.
11. Arzneipräparat nach Anspruch 9 und 10 in einer für Injektionen geeigneten Form.

2547●6

- 19 -

13.

12. Arzneipräparat nach Anspruch 9 und 10 in einer für die Anwendung an der Schleimhaut der Nase oder des Rachens geeigneten Form.

709817/0908

• DIPL.-CHEM. DR. ELISABETH JUNG
DIPL.-PHYS. DR. JÜRGEN S. IRDEWAHN
DR.-ING. GERHARD SCHWITT-NILSON
PATENTANWÄLTE

8 MÜNCHEN 40,
CLEMENSSTRASSE 30
TELEFON 089 2547696
TELEGRAMM ADRESSE: INVENT/MÜNCHEN
TELEX 5-21 686

2547696

-4.

J 867 C (J/MK/gs)

24. Oktober 1975

B.201

BEECHAM GROUP LIMITED

Brentford, Middlesex, Großbritannien

"Antivirale Substanz, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Substanz enthaltende Arzneipräparate"

Es ist an sich bekannt, daß doppelstrangige Ribonucleinsäuren, die nachstehend RNS abgekürzt werden, hochwirksame Interferon-Induktoren und daher von großer Bedeutung für die Breitspektrum-Prophylaxe von Virusinfektionen sind und in einem geringeren Ausmaß auch zur Behandlung derartiger Infektionen eingesetzt werden können. Sowohl die synthetischen als auch die Ribonucleinsäuren natürlichen Ursprungs weisen Interferon-Induktoren-Aktivität sowie antivirale Aktivität in Gewebekulturen und bei Tieren auf. Doppelstrangige Ribonucleinsäuren mit antiviraler Aktivität können z.B. aus Viruspartikeln extrahiert werden, die u.a. in bestimmten infizierten Pilzen vorkommen, wie in einigen Stämmen von *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium stoloniferum*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus foetidus*. Außerdem kommen derartige Ribonucleinsäuren in cytoplasmatischen Polyhedrosisviren,

709817/0908

in Reovirus-3-Virion sowie in der replikativen Phagenform MS2 aus E.coli und in der replikativen Phagenform von MU9 eines mutanten E. coli vor.

Es bestehen jedoch Anzeichen dafür, daß doppelstrangige Ribonucleinsäuren natürlichen Ursprungs beim Menschen und bei Tieren eine zu hohe toxische Nebenwirkung haben. Ihre Anwendung in der Human- und der Veterinärmedizin ist daher beschränkt.

Es besteht daher ein Bedarf für ein antivirales Mittel, das weniger toxisch als doppelstrangige Ribonucleinsäure allein ist, und dessen antivirale Aktivität vergleichbar oder besser ist.

Es ist an sich bekannt, daß Nucleinsäuren mit vielen basischen Polypeptiden, wie Protaminen und Polylysin, ionische Komplexe bilden. Die meisten dieser Arbeiten jedoch befassen sich mit den Komplexen von Polybasen und Desoxyribonucleinsäure und einstrangiger Ribonucleinsäure. Diese Polybase-Nucleinsäure-Komplexe sind gegen Nuclease-Abbau und thermische Denaturierung stabiler als die Stamm-Nucleinsäure. Als man entdeckte, daß synthetische doppelstrangige Ribonucleinsäuren Interferon-Induktoren sind, glaubte man, daß die Behandlung der doppelstrangigen Ribonucleinsäure mit Polybasen zu einer Stabilisierung gegen den Abbau durch Ribonuclease führt und somit zu einer verbesserten oder verlängerten antiviralen Aktivität in vivo. Die Ergebnisse dieser Arbeiten waren jedoch nicht sehr ermutigend. Billiau und Mitarbeiter (siehe Ann. N.Y. Acad. Sci., 173 (1), S. 657 (1970)) berichteten, daß die Stimulierung durch doppelstrangige Ribonucleinsäure des Interferon-Mechanismus in Gewebekulturen bis zu 100fach erhöht

- 2 -

- 6 -

werden kann durch Zugabe von polybasischen Substanzen, wie Neomycin, Streptomycin, Diäthylaminoäthyl-dextran, methyliertem Albumin, Protamin, Histon und Colistin. Diese Verbindungen waren dafür bekannt, daß sie die Wirkung der Ribonuclease hemmen oder die Aufnahme von Ribonucleinsäure in die Zelle erhöhen. Billiau und Mitarbeiter vermuten, daß "einige dieser basischen Substanzen für die Therapie von Virus-Infektionen durch Interferon-Induktoren geeignet sein könnten", schränken jedoch ein, daß "die Interferon-Induktion durch Poly-I : Poly-C in vivo durch Diäthylaminoäthyl-dextran, jedoch nicht durch Neomycin oder Protamin erhöht würde".

Hochmolekulares Poly-D-Lysin erhöht die Interferon-Induktion durch Poly-I : Poly-C in Mäusen und ist diesbezüglich dem Diäthylaminoäthyl-dextran überlegen (siehe Rice und Mitarbeiter in "Appl. Microbiol. 19 (5), S. 867 (1970)). Die mit einer Kombination von Poly-I : Poly-C und Poly-D-Lysin behandelten Tiere zeigten keine unmittelbaren Zeichen von Toxizität, die Dosis des Materials lag jedoch deutlich unter der Dosis, bei der die toxischen Wirkungen von Poly-I : Poly-C allein auftreten.

Die FR-PS 178 953 offenbart ein Präparat, das 1 mg doppelsträngige Ribonucleinsäure, 200 µg Polyornithin und 50 mg Vitamin B₆ enthält. Das Polyornithin soll die Aufnahme der Ribonucleinsäure in die Zellen erhöhen.

Die Literatur ließ vermuten, daß Komplexe von gewissen Polybasen mit doppelsträngiger Ribonucleinsäure die Interferon-Spiegel in vitro und in vivo erhöhen und/oder verlängern würden. Es ist

709817/0908

jedoch bekannt, daß der Interferon-Spiegel nicht unbedingt mit der antiviralen Aktivität parallel geht. Eine Verbindung, die nur eine geringe Interferon-induzierende Wirkung hat, kann jedoch ein sehr gutes antivirales Mittel sein und umgekehrt. Außerdem besteht in der Literatur keine Übereinstimmung darüber, welche Art von Polybase notwendig ist, um in vivo erhöhte Interferon-Spiegel zu erreichen. Kombinationen von Protamin und doppelstrangiger Ribonucleinsäure scheinen weniger zufriedenstellend zu sein als doppelstrangige Ribonucleinsäuren allein, wogegen Kombinationen von doppelstrangiger Ribonucleinsäure und Diäthylaminoäthyl-dextran ihr überlegen sind. Diese widersprechenden Ergebnisse machen es unmöglich, zu sagen, ob und welche einen ionischen Komplex bildende Kombination von doppelstrangiger Ribonucleinsäure mit einer Polybase bezüglich der Interferon-induzierenden Aktivität, weniger der antiviralen Aktivität, der doppelstrangigen Ribonucleinsäure allein überlegen ist.

Die Brauchbarkeit eines antiviralen Mittels hängt im wesentlichen von zwei Faktoren ab: Von der Dauer der durch eine bestimmte Dosis des Mittels erreichten Schutzwirkung und der Toxizität des Mittels. Die Dauer der Schutzwirkung hängt nicht unbedingt von der Fähigkeit, die Interferon-Produktion zu induzieren, ab, und wird daher auch nicht, gemäß der Literatur, von der Zugabe einer Polybase beeinflusst. Was die Toxizität eines antiviralen Mittels betrifft, ist in der Literatur nichts zu finden.

Es wurde nun festgestellt, daß Komplexe von doppelstrangiger Ribonucleinsäure natürlichen Ursprungs mit Polyarginin weniger toxisch sind, zumindest bei kleinen Säugetieren, als die doppelstrangige

- 5 -

Stamm-Ribonucleinsäure, und daß diese Komplexe eine längere antivirale Schutzwirkung haben als die entsprechende Ribonucleinsäure.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine antivirale Substanz, die im wesentlichen ein ionischer Komplex ist, der dadurch gekennzeichnet ist, daß die Kationen Polykationen eines linearen Polyargininmoleküls mit mindestens 5 Arginin-Einheiten und die Anionen entweder

- a) Polyanionen einer doppelstrangigen Ribonucleinsäure natürlichen Ursprungs oder
- b) Polyanionen eines doppelstrangigen Derivats einer natürlichen doppelstrangigen Ribonucleinsäure sind.

Der Ausdruck "doppelstrangig" bezieht sich auf die Tatsache, daß zwei getrennte Ribonucleinsäure-Moleküle durch Wasserstoff-Brückenbindung zwischen den komplementären Basen längs des Moleküls assoziiert sind. Die Ribonucleinsäuren können verschieden stark "doppelstrangig" sein.

Der Ausdruck "doppelstrangige Ribonucleinsäure natürlichen Ursprungs" betrifft jede doppelstrangige Ribonucleinsäure, die aus den oben angegebenen Pilzen extrahiert werden kann, und schließt synthetische doppelstrangige Ribonucleinsäuren, wie Polyinosinyl-: Polycytidylsäure (Poly-I : Poly-C), Polyadenyl-: Polyuridylsäure (Poly-A : Poly-U) und Polyguanidyl-: Polycytidylsäure (Poly-G : Poly-C) aus.

Der Ausdruck "doppelstrangiges Derivat einer natürlichen doppelstrangigen Ribonucleinsäure" betrifft jede natürliche doppelstran-

709817/0908

gige Ribonucleinsäure, die einer chemischen oder biochemischen (z.B. enzymatischen) Reaktion unterworfen wurde, welche die primäre und/oder sekundäre und/oder tertiäre Struktur verändert (z.B. die N-Oxide gemäß der GB-PS 1 284 150 oder die alkali-modifizierten doppelstrangigen Ribonucleinsäuren gemäß DT-OS 2 201 513). Voraussetzung ist, daß das entstandene Derivat noch einen wesentlichen Teil der Basenpaare der komplementären Stränge besitzt.

Die Doppelstrangigkeit einer doppelstrangigen Ribonucleinsäure oder deren Derivat kann durch zwei Parameter, die Hyperchromizität und den Tm-Wert, charakterisiert werden. Diese Parameter werden durch Aufzeichnen der UV-Absorption des Materials bei 260 nm erhalten, während die Temperatur allmählich gesteigert wird. Die UV-Absorption einer doppelstrangigen Ribonucleinsäure bei dieser Wellenlänge steigt mit steigender Temperatur, bis ein konstanter Wert erreicht ist, der der Absorption der thermisch denaturierten (z.B. einstrangigen) Ribonucleinsäure entspricht. Die Differenz zwischen den beiden Grenzwerten der Absorption, ausgedrückt als Prozentsatz der Absorption des doppelstrangigen Materials, wird als die "Hyperchromizität" dieses Materials bezeichnet.

Wird die UV-Absorption bei 260 nm eines doppelstrangigen Materials gegen die Temperatur aufgetragen, so stellt man fest, daß die Absorption bei hohen Temperaturen größer als bei niedrigen Temperaturen ist. Die Temperatur, bei der die Absorption in der Mitte zwischen der Absorption des doppelstrangigen Materials und der des thermisch denaturierten (z.B. einstrangigen) Materials liegt, wird als Tm-Wert dieses Materials bezeichnet.

Das im erfindungsgemäßen Komplex als Kation verwendete Polyarginin-Molekül hat ein Molekulargewicht von 1500 bis 1 000 000, vorzugsweise etwa 6500. "Linear" heißt, daß in dem Polyarginin-Molekül keine Vernetzungen zwischen den basischen Aminogruppen der Arginin-Einheiten bestehen.

Als Polyarginin-Molekül geeignet ist ein Poly-D-, Poly-L- oder Poly-D,L-Arginin-Molekül. Bevorzugt ist ein Poly-L-Arginin-Molekül.

Vorzugsweise stammen die als Polyanionen verwendeten doppelsträngigen Ribonucleinsäuren aus Virusteilchen, die in bestimmten infizierten Pilzen vorhanden sind, z.B. in bestimmten Pilzen der Gattung *Penicillia*, z.B. *P.chrysogenum* (GB-PS 1 170 929), *P.stoloniferum* (Banks und Mitarbeiter, *Nature*, Bd. 223, S. 155 (1968)) und *Aspergilli*, z.B. *A.niger* und *A.foetidus* (GB-PS 1 300 259). Vorzugsweise sollten die Polyanionen (a) und (b) die Interferon-Produktion in lebenden Säugetieren induzieren (das kann durch die Methode von G.P. Lampson, A.A. Tytell, A.K. Field, M.M. Nemes und M.R. Hilleman in "*Proc.Nat.Acad.Sci.*", Bd. 58, S. 782 (1967) bestätigt werden).

Die erfindungsgemäße antivirale Substanz ist im wesentlichen ein ionischer Komplex, der durch eine starke elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem kationischen Polyarginin-Anteil und dem anionischen Anteil der Ribonucleinsäure charakterisiert ist. Es sind jedoch auch andere Arten von Wechselwirkungen möglich; Genaues über diese Art von Bindungen weiß man jedoch nicht.

In den erfindungsgemäßen Komplexen sind praktisch alle anionischen Stellen der doppelstrangigen Ribonucleinsäure durch entsprechende kationische Stellen des Polyarginins neutralisiert, wobei die kationischen Stellen die basischen Aminogruppen der Argininmonomere sind. Um diese Neutralisation der kationischen und anionischen Stellen zu erreichen, verwendet man das Polyarginin entweder als einzelnes Molekül mit einer den anionischen Stellen der doppelstrangigen Ribonucleinsäure entsprechenden Anzahl an kationischen Stellen oder als kleinere Polyarginin-Moleküle, wobei die Summe der kationischen Stellen den anionischen Stellen der doppelstrangigen Ribonucleinsäure entspricht. Mit diesen "1 : 1"-Komplexen erhält man eine lange antivirale Schutzdauer und eine niedrige Toxizität.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der antiviralen Substanz, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man in Lösung lineares Polyarginin oder dessen Salz entweder mit

- a) Polyanionen einer doppelstrangigen Ribonucleinsäure natürlichen Ursprungs oder
- b) Polyanionen eines doppelstrangigen Derivats einer natürlichen doppelstrangigen Ribonucleinsäure umsetzt.

Man kann die Polyarginin-Polykationen in wässriger Lösung mit den Ribonucleinsäure-Polyanionen umsetzen. So kann man Polyargininhydrochlorid in der wässrigen Lösung eines anorganischen Salzes, z.B. Natriumchlorid, lösen und mit einer entsprechenden Lösung der Ribonucleinsäure vermischen. Wenn die Molarität der entstandenen Salzlösung nicht zu hoch ist, fällt der Komplex sofort aus. Ist das nicht der Fall, so kann man die Lösung zur Verminderung

der Molarität verdünnen, der Komplex fällt dann aus.

Man kann aber auch ein Gemisch des neutralen Polyarginins und der Ribonucleinsäure oder deren Derivat zu einer Salzlösung zugeben und die entstandene Lösung gegebenenfalls verdünnen, um den Komplex auszufällen.

Vorzugsweise verwendet man einen geringen Überschuß an Polyarginin-Polykationen, wobei der Überschuß anhand der basischen Aminogruppen, die mit den Phosphorsäuregruppen der Ribonucleinsäure-Polyanionen reagieren können, berechnet wird.

Die erfindungsgemäßen Komplexe besitzen antivirale Aktivität mit einem breiten Spektrum gegen eine Anzahl von Desoxyribonucleinsäure- und Ribonucleinsäure-Viren, z.B. Encephalomyocarditis-Virus, Semliki-Forest-Virus, gegen den Maul- und Klauenseuche hervorrufenden Virus und gegen den Herpes-Simplex-Virus. Vermutlich induzieren die erfindungsgemäßen Komplexe die Interferon-Produktion in den Wirtszellen und schützen somit gegen den Angriff der Viren.

Überraschenderweise ist die Toxizität dieser Komplexe (gemessen als LD₅₀ bei Mäusen) niedriger als die von Ribonucleinsäure allein.

Die Erfindung betrifft somit Arzneipräparate, die durch einen Gehalt an erfindungsgemäßer antiviraler Substanz als Wirkstoff, gegebenenfalls in Kombination mit pharmakologisch verträglichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln gekennzeichnet sind.

709817/0908

Die Wahl des Trägerstoffes richtet sich nach der bevorzugten Art der Verabreichung. Man kann die erfindungsgemäßen Arzneipräparate z.B. subcutan oder intramuskulär injizieren. Die erfindungsgemäße antivirale Substanz ist dann im Verdünnungsmittel entweder gelöst oder als feine Dispersion suspendiert. Bei lokaler Anwendung, z.B. an der Schleimhaut der Nase oder des Rachens, ist der Trägerstoff ein Verdünnungsmittel.

Die Beispiele erläutern die Erfindung. Die Abkürzung "d.s.-RNS" bedeutet doppelstrangige Ribonucleinsäure.

B e i s p i e l 1

Herstellung eines Komplexes aus ds-RNS, die aus P.chrysogenum, ATCC 10002 virusähnlichen Partikeln isoliert wurde, und Poly-arginin

Eine gerührte Lösung von 100 mg ds-RNS-Natriumsalz in 200 ml 0,15 m Natriumchlorid wird bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 200 mg Poly-L-Arginin mit einem Molekulargewicht von 6500 in 200 ml 0,15 m Natriumchlorid versetzt. Es fällt sofort ein Niederschlag aus. Das Reaktionsgemisch wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann zentrifugiert. Gemäß dem UV-Spektrum enthält die überstehende Lösung keine Nucleinsäure. Der Niederschlag wird mit 200 ml Wasser, dann mit 200 ml Methanol gewaschen und bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck getrocknet. Man erhält 162 mg des Komplexes als weißen Feststoff. Das Produkt ist in 3 m Natriumchlorid unlöslich. Für die biologischen Versuche wird der erfindungsgemäße Komplex als Suspension eingesetzt.

Biologische Daten(a) Toxizität bei Mäusen

Die Toxizität der als Ausgangsmaterial eingesetzten doppelstrangigen Ribonucleinsäure und der nach Beispiel 1 hergestellten Komplexe wird in 16 bis 20 g schweren Mäusen, Stamm CD1, verglichen. Die Verbindungen werden intraperitoneal injiziert, die Tiere werden 10 Tage lang beobachtet. Tabelle I faßt die Ergebnisse zusammen.

T a b e l l e I

Toxizität des erfindungsgemäßen antiviralen Komplexes. Die Dosis bezieht sich auf die Menge an jeweils vorhandener doppelstrangiger Ribonucleinsäure. Die Sterblichkeit ist in Anzahl toter Tiere/Anzahl von Tieren in einer Gruppe angegeben

Verbindung	Dosis (mg/kg)	Sterblich- keit	LD ₅₀ (mg/kg)
ds-RNS-Polyarginin-Komplex in 1,5 m NaCl (Suspension)	25	0/5	>100
	50	0/5	
	100	0/5	
ds-RNS in 0,15 m NaCl	12,5	1/10	25
	25	5/10	
	50	9/10	

(b) Antivirale Aktivität

Die Verbindungen werden 16 bis 20 g schweren Mäusen, Stamm CD1, intraperitoneal injiziert. 24 oder 72 Stunden später werden diesen Mäusen eine oder zwei Verdünnungen von Encephalomyocarditis-Virus intraperitoneal injiziert. Die Tiere werden 12 Tage lang

709817/0908

25476

- 12 -
15

beobachtet, die Sterblichkeit wird mit der unbehandelten Kontroll-
mäuse verglichen. Tabelle II faßt die Ergebnisse zusammen.

709817/0908

T a b e l l e II

- 13 -

Antivirale Kurzzeitaktivität des erfindungsgemäßen ds-RNS-Polyarginin-Komplexes:

Anzahl toter Tiere von 10 in jeder Gruppe												
Antivirale Daten (Encephalomyocarditis-Virus)												
Verbindung	Verbindung 3 Tage vor der Virusinfektion verabreicht					Verbindung 1 Tag vor der Virusinfektion verabreicht						
	Virus-Dosis 10^{-4}		Virus-Dosis 10^{-5}			Virus-Dosis 10^{-4}			Virus-Dosis 10^{-5}			
	Verbindung-Dosis (mg/kg)											
	5	0,5	0,05	5	0,5	0,05	5	0,5	0,05	5	0,5	0,05
ds-RNS in 0,15 m NaCl ds-RNS/poly-L-Arginin-Komplex, Suspension in 1,5 m NaCl	9	9	7	3	4	7	4	3	6	0	2	2
	10	10	10	8	7	6	10	10	9	5	10	9
	unbehandelte Kontrollen Sterblichkeit						Virale Dosis 10^{-4} 20/20			Virale Dosis 10^{-5} 18/20		

709817/0908

Herstellung eines Komplexes aus ds-RNS, die aus P.chrysogenum ATCC 10002 virusähnlichen Partikeln isoliert wurde, und Poly-arginin

Eine gerührte Lösung von 500 mg ds-RNS-Natriumsalz in 500 ml 0,15 m Natriumchlorid wird bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 318 mg Poly-L-Arginin-Hydrochlorid (Miles-Code-Nr. 71-103A) in 100 ml 0,15 m Natriumchlorid versetzt. Es fällt ein Niederschlag aus. Das Gemisch wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann über Nacht bei 4°C stengelassen. Der Niederschlag wird zentrifugiert. Gemäß dem UV-Spektrum enthält die überstehende Lösung keine Nucleinsäure. Der Niederschlag wird in 50 ml 0,15 m Natriumchlorid suspendiert und noch einmal zentrifugiert. Der Niederschlag wird in 0,15 m Natriumchlorid suspendiert und zerkleinert. Man erhält eine feine Suspension des Komplexes mit einem ds-RNS-Gehalt von 20 mg/ml. Das Produkt ist in 3 m Natriumchlorid unlöslich. Für die biologischen Versuche wird es als Suspension verwendet.

Wirkungsdauer

Der Schutz, den die erfindungsgemäßen Komplexe gegen niedrige (8 x LD₅₀) und hohe (80 x LD₅₀) Infektionswerte des Encephalomyocarditis-Virus gewährleisten, wird in einzelnen Zeitintervallen bis zu 5 Wochen bewertet. 16 bis 20 g schweren Mäusen, Stamm CD1, wird die erfindungsgemäße antivirale Substanz subcutan injiziert. 0, 1, 7, 21 oder 35 Tage danach werden diesen Mäusen eine oder zwei Verdünnungen von Encephalomyocarditis-Virus intraperitoneal injiziert. Die Tiere werden 12 Tage beobachtet, die Sterblich-

keitsrate von mit Komplex behandelten Tieren wird mit der von Kontrollmäusen verglichen, die eine entsprechende Dosis von ds-RNS entweder intraperitoneal oder subcutan und entsprechende Mengen Encephalomyocarditis-Virus erhalten hatten. Die Zeitintervalle, die Dosismengen und die Verabreichungsart sind in Tabelle III und IV zusammengefaßt. Da die Tiere am Ende der Vorbehandlungszeit ungewöhnlich groß waren, wurde am siebten Tag die für diesen Versuch notwendige Virus-Dosis bestimmt, die 50 % der Testtiere tötet. Dementsprechend konnten dann die Virus-Dosen gewählt werden.

EMC LD₅₀ im Versuch : $10^{-6,9}$

am Ende : $10^{-6,6}$

wobei LD₅₀ die Dosis an Virus ist, die 50 % der Tiere tötet.

T a b e l l e III

Dauer der Schutzwirkung des erfindungsgemäßen Komplexes bei Mäusen, denen Encephalomyocarditis-Virus in einer 8 x LD₅₀-Menge injiziert wurde. Angegeben ist die Anzahl toter Tiere/Tiere einer Gruppe

Verbindung	Dosis (mg/kg)	Verab- reichung	Vorbehandlungszeit (Tage)			
			1	7	21	35
ds-RNS	5	i.p.	0/10	3/10	-	-
ds-RNS	5	s.c.	0/10	7/10	-	-
Komplex	100	s.c.	6/10	3/10	1/9	2/10
Kontrollen	-	-	10/10	-	-	-

25476

- 10 -

19.

T a b e l l e IV

Schutzwirkung bei Mäusen, denen Encephalomyocarditis-Virus in einer $80 \times LD_{50}$ -Menge injiziert wurde. Angegeben ist die Anzahl toter Tiere/Tiere einer Gruppe.

Verabreichungszeit (Tage)						
Verbindung	Dosis (mg/kg)	Verab- reichung	1	7	21	35
ds-RNS	5	i.p.	0/10	10/10	-	-
ds-RNS	5	s.c.	2/10	10/10	-	-
Komplex	100	s.c.	10/10	5/10	5/10	9/10
Kontrollen	-	-	10/10	-	-	-

709817/0908

ORIGINAL INSPECTED